

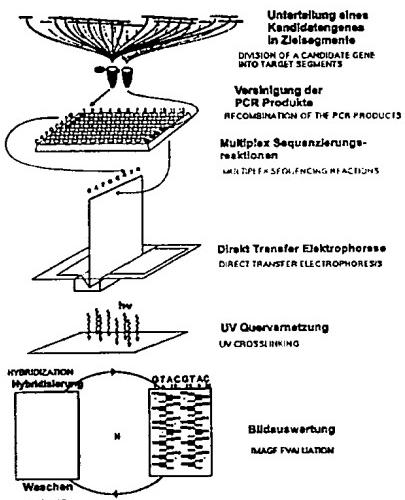
PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro



INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : C12Q 1/68	A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 99/57308 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 11. November 1999 (11.11.99)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE99/01385		(81) Bestimmungsstaaten: AL, AM, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CN, CU, CZ, EE, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, RO, RU, SD, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).
(22) Internationales Anmeldedatum: 3. Mai 1999 (03.05.99)		Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist; Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i>
(30) Prioritätsdaten: 198 21 114.7 6. Mai 1998 (06.05.98) DE		
(71) Anmelder (<i>für alle Bestimmungsstaaten ausser US</i>): GENFILE AG [DE/DE]; Robert-Rössle-Strasse 10, D-13125 Berlin (DE).		
(72) Erfinder; und		
(75) Erfinder/Anmelder (<i>nur für US</i>): HOEHE, Margret [DE/DE]; Bartningallee 7, D-10557 Berlin (DE). KÖPKE, Karla [DE/DE]; Franz-Schmidt-Strasse 19, D-13125 Berlin (DE).		
(74) Anwalt: BAUMBACH, Fritz; Robert-Rössle-Strasse 10, D-13125 Berlin (DE).		
(54) Title: METHOD FOR IDENTIFYING AND REPRESENTING INTERINDIVIDUAL DIFFERENCES OF DNA SEQUENCES		
(54) Bezeichnung: METHODE ZUR IDENTIFIZIERUNG UND DARSTELLUNG INTERINDIVIDUELLER DNA-SEQUENZUNTERSCHIEDE		
(57) Abstract		
<p>The invention relates to a method for identifying and representing interindividual differences of DNA sequences. The invention is characterized in that; the genomic DNA of the individuals to be examined are isolated; segments of the genes to be compared, genomic regions, and genomes are defined; these segments are isolated in a targeted manner by means of PCR while using highly specific oligonucleotides and are produced in a sufficient number of copies; a simultaneous sequencing of all obtained gene segments is carried out, said gene segments now being available as PCR products; afterwards, the mixture of termination reactions which is produced thereby and which contains the individual sequences of all gene segments is electrophoretically separated on a sequencing gel; the mixture is transferred onto a membrane by means of direct transfer electrophoresis; afterwards, the individual sequences of a determined gene segment from the original mixture are made visible by hybridizing the membrane with a marked, highly specific oligonucleotide; this process is repeated until all gene segments from the common pool are detected; afterwards, interindividual differences of DNA sequences are detected by image analysis, and a genetic profile model is established and evaluated by mathematical processing.</p>		
(57) Zusammenfassung		
<p>Die Erfindung betrifft eine Methode zur Identifizierung und Darstellung interindividueller DNA-Sequenzunterschiede. Sie ist dadurch gekennzeichnet, daß man die genomische DNA der zu untersuchenden Individuen isoliert, Segmente der zu vergleichenden Gene, genomischen Regionen, Genome definiert, diese Segmente mittels PCR unter Verwendung hochspezifischer Oligonukleotide gezielt isoliert und in einer ausreichenden Anzahl von Kopien herstellt, eine simultane Sequenzierung aller gewonnenen Gensegmente, die nun als PCR-Produkte vorliegen, durchführt, das dadurch entstehende Gemisch von Terminationsreaktionen, das die individuellen Sequenzen aller Gensegmente enthält, anschliessend auf einem Sequenziergel elektrophoretisch trennt und mittels direkter Transferelektrophorese auf eine Membran überträgt, anschliessend durch Hybridisierung der Membran mit einem markierten, hochspezifischen Oligonukleotid die individuellen Sequenzen eines bestimmten Gensegments aus dem ursprünglichen Gemisch sichtbar macht, diesen Vorgang so oft wiederholt, bis alle Gensegmente aus dem ursprünglichen Pool detektiert sind, und anschliessend durch Image-Analyse interindividuelle DNA-Sequenzunterschiede detektiert, und durch mathematische Aufarbeitung ein Genprofilmuster erstellt und auswertet.</p>		



LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		

Methode zur Identifizierung und Darstellung interindividueller DNA-Sequenzunterschiede

Die Erfindung betrifft eine Methode zur Identifizierung und Darstellung interindividueller DNA-Sequenzunterschiede. Anwendungsgebiete der Erfindung sind die Molekularbiologie, die Medizin, die Biologie, die Veterinärmedizin, die Agrarwirtschaft und die Ökobiologie.

Nach der erstmaligen Sequenzierung eines menschlichen Referenzgenoms, die im Jahre 2005 abgeschlossen sein wird, nach der Dokumentierung gesamtgenomischer Sequenzen verschiedenster Modellorganismen und Bakterien sowie der Sequenzierung aller Gene des Menschen und anderer Species wird die vergleichende Untersuchung individueller genetischer und genomicscher Variabilität einer der Schwerpunkte der nächsten Ära der Genomforschung ('Postgenomics') werden. Sie stellt eine 'via regia' zur Erforschung von Gesamtgen- und Genomprofilen dar, die instrumentell für die Identifizierung von Varianten bzw. Gensegmenten ist, die an der Pathogenese von Erkrankungen beteiligt sind, und die Variabilität physiologischer und psychologischer Merkmale mitbedingen. Es ist deshalb entscheidend, zum gegenwärtigen Zeitpunkt entsprechende methodische Ansätze zu entwickeln, die die vergleichende Sequenzierung mit geringerem Aufwand ermöglichen, und zugleich eine Ausgangsbasis für die zukünftige Entwicklung noch wesentlich effizienterer Methoden schaffen.

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, eine Methode der vergleichenden Sequenzierung von DNA-Zielfragmenten als virtuelle Analyse-Einheiten von Genen und Genomen auf der Basis eines Multiplexing-Prinzipes zu entwickeln.

Die Erfindung wird gemäß den Ansprüchen realisiert.

Diese Erfindung stellt eine Form der 'targeted genome analysis' dar. Sie beruht auf dem Grundprinzip der von Church und Kieffer-Higgins beschriebenen 'Multiplex Sequenziermethode' (EP 303 459), das für die de novo Sequenzierung genomicscher Sequenzen ausgearbeitet ist.

Die erfindungsgemäße PCR-basierte Multiplex Sequenziermethode stellt jedoch konzeptionell und inhaltlich eine vollkommene Neuentwicklung dar (vgl. Abb. 1 und Abb. 1 b). Die erfindungsgemäße Multiplex-PCR-Sequenziermethode ist hingegen spezifisch für die Identifizierung von Sequenzunterschieden in multiplen Kopien bekannter Sequenz konzipiert. Das Verfahren zur Klonselektion, -amplifikation und Tagging ist vollkommen neu entwickelt worden. Auch basiert die neue Methode nicht auf der Verwendung von Hybrid-DNA, die

unerlässliche Grundlage des Church-Verfahrens ist.

Die neue Methode konzentriert sich in dieser neudefinierten Form auf multiple, PCR-generierte Kopien von definierten genomischen Zielregionen-/Kandidatengensegmenten, deren simultane Sequenzierung in einem einzigen Sequenziervorgang stattfindet, auch die hochspezifische Detektierung individueller Sequenzen ein- und desselben, definierten Segments aus einem Gemisch multipler Reaktionen/segmentspezifischer Sequenzen, und auf die Identifizierung interindividueller DNA-Sequenzunterschiede zwischen individuellen Genen durch Gruppierung basenspezifischer individueller Terminationsreaktionen und Detektion von Sequenzunterschieden unmittelbar durch visuelle Inspektion (vgl. Abb. 2). Eine hohe Qualität der 'Images' und damit die Voraussetzung für die Identifizierung von Sequenzunterschieden ist durch eine hohe Spezifität der Oligonukleotide auf PCR-, Sequenzier-, und Detektionsebene gegeben. Der Gesamtvorgang der 'Multiplex PCR Sequenzierung' beinhaltet folgende methodische/technologische Segmente:

Hervorzuheben sind als wesentliche Unterschiede zum EP-A- 303 459:

Basis für Multiplex-Sequenzierung ist nicht Hybrid-DNA, die ein beliebig fragmentiertes genomisches DNA-Fragment enthält, sondern durch hochspezifische Oligonukleotide selektierte DNA-Zielfragmente; 'tags' sind nicht extern synthetisierte Oligos und Bestandteil des Vektors, ebenso sind 'sequencing primer hybridizing regions' nicht Bestandteil des Vektors, sondern integraler Bestandteil des genomischen Zielfragmentes; DNA Sequenzinterpretation durch Parallelisierung vielfacher individueller Terminationsreaktionen derselben Base zur unmittelbaren Identifizierung von DNA Sequenzunterschieden als zusätzliche und fehlende Banden mittels visueller Inspektion unmittelbar identifiziert werden (Abb. 2).

- a) Die Dissektion ('Zergliederung') eines Gens, Genoms, oder jeder genomischen Zielregion von Interesse in DNA-Segmente, die Templates für die Amplifizierung mittels PCR darstellen. Unterschiedliche Ansätze zur Aufteilung in DNA-Segmente/PCR-Fragmente sind a) overlapping design (Abb. 3), b) staggered design (Abb.4), c) virtual dissection at the sequencing level (Abb. 5). Die Art der Zergliederung und damit der Multiplex-Faktor bzw. die Ausschöpfung der Kapazität der Methode steht in Zusammenhang mit der genomischen Organisation und Größe des Gens, der Anzahl sich nichtüberlappender Gensegmente und dem Umfang des geplanten Sequenziervorhabens (Anzahl der Gene bzw. Genome), sowie technischen Gesichtspunkten wie dem multifunktionalen Gebrauch von Oligonukleotiden als PCR-Primer, Sequenziprimer, und 'Probes'.
- b) Die Amplifizierung multipler, N DNA-Segmente pro Individuum; diese kann separat für jedes Segment stattfinden (oder z.B. durch Amplifizierung großer Segmente, die mehrere

Sequenziersegmente, auch virtuelle Gensegmente genannt, beinhalten, vgl. Abb. 5), oder simultan durch Multiplex PCR. Die Vereinigung multipler, N PCR-Produkte pro Individuum. Erzeugung multipler einsträngiger 'Templates' mittels irreversibler Biotin-Streptavidin-Kopplung unter Verwendung von 'magnetic beads' aus einem Gemisch von PCR-Produkten. Hier bestehen Modifikationsmöglichkeiten der Separierung der beiden DNA-Stränge; es könnten auch biotinylierte Terminationsreaktionen magnetisch separiert werden.

- c) Die Reinigung jedes PCR-Produktes ist möglich auf enzymatischem Wege, durch Säulen, Vakumsysteme etc.; es kommen also unterschiedliche Reinigungsmethoden in Betracht.
- d) Die simultane Durchführung von multiplen, N Sequenzierreaktionen mittels Einsatz multipler, N Sequenzierprimer unterschiedlicher Nukleotidkomposition, die jeweils hochspezifisch an ein bestimmtes genomisches Fragment binden. Im Falle daß per Design diesselbe DNA-Sequenz zwei benachbarten PCR-Fragmenten gemeinsam sein sollte (d.h. daß der Sequenzierprimer zugleich an zwei benachbarte Fragmente binden könnte), wird die Konzentration der Sequenzierprimer verdoppelt (vgl. auch Abb. 3). Die Multiplex Sequenzierung erfolgt mittels der Dideoxy-Methode nach Sanger et al. (74 Proc.Natl.Acad.Sci.USA 5463, 1977) unter Verwendung von T7/Mn für die Sequenzierung einsträngiger DNA, bzw. Thermosequenase für 'cycle sequencing', hier Detektion sowohl eines oder beider Stränge; Alternative: multiplexing auf der Geleebene; Vereinigung individueller Sequenzierreaktionen, Auflösung der Terminationsreaktionsgemische auf dem Gel; ebenso als Möglichkeit 'coupled amplification und genomic sequencing' zu integrieren.
- e) Die direkte Transferelektrophorese (DTE) der Gemische von Terminationsreaktionen auf einen festen Träger, eine Nylonmembran, mittels eines computer-gesteuerten Gradienten der Transfergeschwindigkeit, um einen adäquaten Bandenabstand zur Detektion von Sequenzunterschieden zu erreichen. Fixierung der DNA an die Membran mittels UV-Licht durch Interkalation.
- f) Die sukzessive Detektion multipler individueller DNA-Sequenzen der jeweiligen PCR-Segmenta mittels hochspezifischer Sonden, die mit ^{32}P -ATP endmarkiert ist, oder Chemilumineszenz. Die dem Sequenzierprimer unmittelbar benachbarte Nukleotidsequenz dient als 'tag', als 'probe hybridizing region'; durch Nichtüberlappung der 'tag' Sequenz mit der Sequenzierprimersequenz wird die Detektion unspezifischer Sequenz durch 'mispriming' vermieden, und damit Hintergrundrauschen, das mit der Variantendetektion interferieren könnte.
- g) 'Image-Analyse durch 'Mustererkennung''. Ein spezifisches Ladeschema, welches die basenspezifischen Terminationsreaktionen von je 12 Individuen als Block gruppiert, können DNA-Sequenzunterschiede unmittelbar durch zusätzliche und/oder fehlende Banden identifiziert werden.

Methode zur Merkmals- und Risikodifferenzierung von genetischen Profilen auf DNA-Sequenzebene

Die Methode dient zur Erarbeitung von spezifischen Genprofilmustern, die eine genetische Differenzierung für das Risiko von Erkrankungen bzw. für die Ausprägung phänotypischer Merkmale jeder Art in jeder Species zuläßt, aus einer großen Menge von Sequenzdaten bzw. Sequenzvarianten (z.B. auch "single nucleotide polymorphisms"). Als Ausgangspunkt dienen entweder zwei Gruppen, bestehend aus Erkrankten und Gesunden, oder zwei bezüglich des untersuchten phänotypischen Merkmals differente Gruppen einer Species. Da beispielsweise die Varianten in DNA-Sequenzbereichen, die sowohl die regulierenden als auch die kodierenden Bereiche eines Kandidatengens umfassen, statistisch abhängig sind, werden die aus den Sequenzvarianten eines Gens oder aus den Varianten verschiedener Gene und sonstiger genetischer Marker gebildeten Sequenzprofile in Form von Geno- und/oder Haplotypen simultan ausgewertet. Mit steigender Anzahl von Varianten ergibt sich bei maximaler Auflösung der Variabilität auf DNA-Sequenzebene eine in der Regel statistisch nicht mehr zur Vorhersage auswertbare große Anzahl von verschiedenen Geno- bzw. Haplotypen. Das Verfahren zielt auf die Reduktion der Anzahl dieser verschiedenen Geno- bzw. Haplotypen durch Bildung von Geno- oder Haplotypklassen nach unterschiedlichen Ähnlichkeitskriterien (Abstand der Geno- bzw. Haplotypen im n-dimensionalen Raum (bei n untersuchten Varianten), Anzahl und Art der Variantenaustausche zwischen den einzelnen Geno- bzw. Haplotypen, phylogenetischer Abstand etc.) mittels statistischer Klassifizierungs- oder Fuzzy-Methoden. Ausgehend von der Idee, daß sich Geno- bzw. Haplotypen nicht unterscheiden lassen, wenn die Varianten für die Differenzierung des untersuchten Merkmals bzw. Risikos irrelevant sind, wird zur Klassenbildung beispielsweise eine hierachische Clusteranalyse benutzt und die Veränderungen der Häufigkeitsverteilungen der Haplo- bzw. Genotypen der beiden differenten phänotypischen Gruppen hinsichtlich der Klasseneinteilung von einem Schritt zum anderen ausgenutzt. Schrittweise werden die jeweils ähnlichsten Geno- bzw. Haplotypen in Geno- bzw. Haplotypklassen zusammengefaßt. Jeder Schritt ist durch eine spezifische Fehlerquadratsumme, die sich aus den Abweichungen aller Variablenwerte zu den betreffenden Clustermittelwerten in allen Clustern ergibt, charakterisiert. Mittels eines χ^2 -Testes wird in jedem Schritt überprüft, ob sich die Häufigkeiten der Geno- bzw. Haplotypen in den auf der jeweiligen Stufe gebildeten Geno-bzw. Haplotypklassen zwischen den beiden zu untersuchenden Gruppen signifikant voneinander unterscheiden. Das Verfahren wird fortgeführt, bis alle Haplo- bzw. Genotypen in zwei Klassen zusammengefaßt worden sind. Unter Berücksichtigung der schrittweisen Frequenzveränderungen werden die Schritte mit den größten signifikanten Haplo- bzw. Genotypfrequenzunterschieden zwischen den beiden untersuchten Gruppen zur Klasseneinteilung der Haplo- bzw. Genotypen ausgenutzt. Durch Vergleich der in den Klassen zusammengefaßten Haplo- bzw. Genotypen (Consensusmuster

der Klassen) werden die für das Merkmal oder Risiko relevanten Varianten in Form von genetischen Consensusprofilen abgeleitet. Existiert kein Schritt mit signifikanten Frequenzunterschieden, so kann keine Aussage getroffen werden.

Fiktives, einfaches Beispiel zur Merkmals- und Risikodifferenzierung von genetischen Profilen auf DNA-Sequenzebene mit 4 Varianten

Gegeben seien 30 Personen, die an einer Erkrankung A leiden (Gruppe A der Erkrankten), und weitere 30 Personen, die keine Anzeichen für Erkrankung A tragen (Gruppe G der Gesunden), wobei sich die Gruppen hinsichtlich anderer Merkmale nicht signifikant unterscheiden mögen. Von allen 60 Personen und deren Eltern seien die individuellen DNA-Sequenzen eines zu untersuchenden Kandidatengens beispielsweise mittels Multiplex-Sequenzierung bestimmt. An 4 verschiedenen Sequenzpositionen P1, P2, P3 und P4 möge eine Mutation auftreten. Es soll geklärt werden, ob spezifische Haplotypprofile existieren, die mit der Krankheit assoziiert sind.

Für jede Person aus den beiden Gruppen A und G seien die beiden individuellen Haplotypprofile, die durch die Angabe des Vorkommens der Mutation an P1, P2, P3 und P4 bezüglich einer Referenzsequenz vollständig bestimmt werden, gegeben.

Es mögen unter allen 60 Personen die folgenden 6 verschiedenen Haplotypprofile existieren (1: Variante wie in der Referenzsequenz; 2: Variante trägt die jeweilige Mutation):

Nummer des Haplotyps	P1	P2	P3	P4	Häufigkeit in Gruppe A	Häufigkeit in Gruppe G
1	1	2	1	2	7	2
2	1	1	1	1	16	18
3	2	2	2	1	11	16
4	2	2	1	2	10	3
5	1	1	1	2	4	6
6	2	1	2	1	12	15

Zum besseren Verständnis der jetzt folgenden Auswertung, die bezüglich der hierarchischen Clusteranalyse und der Auswertung von Kontingenztafeln mittels des kommerziellen Statistikprogramm-Paketes SPSS für Windows NT, Version 7.5 einschließlich der EXACT-Module vorgenommen wurde, sind in der Anlage zum Beispiel Auszüge des Ausdrucks von SPSS enthalten.

Zur Prüfung von Häufigkeitsunterschieden des Vorkommens dieser 6 verschiedenen Haplotypen (VAR00001= Nummer des Haplotyps) in den Gruppen A (VAR0002=1) und G (VAR0002=2) wurde ein χ^2 -Test durchgeführt. Nach dem exakten Test ($p=0,14$) kann die Gleichheit der Verteilungen nicht abgelehnt werden.

Zur Klassifizierung dieser 6 Haplotypen wird anschließend eine hierarchische Clusteranalyse durchgeführt. Als Distanzmaß wurde in diesem Beispiel die euklidische Distanz als einfaches Maß benutzt. Die Ergebnisse sind in der Anlage enthalten. Im Schritt 1 werden aus den 6 Haplotypen 3 Haplotypklassen gebildet, Klasse 1 aus Haplotypnummer 1 und 4, Klasse 2 aus den Haplotypen Nummer 2 und 5 sowie Klasse 3 aus 3 und 6. Im 2. und für dieses Beispiel letzten Schritt werden Haplotypklasse 1 und 2 zusammengefaßt. Die anschließende Prüfung von Häufigkeitsunterschieden der verschiedenen Haplotypen in den Haplotypklassen des 1. Schrittes ergibt einen signifikanten Unterschied ($p=0,017$) zwischen der Gruppe der Erkrankten und der Gesunden. Im letzten Schritt ist kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden neu entstandenen Haplotypklassen des 2. Schrittes, die durch Vereinigung der Haplotypklassen des 1. Schrittes entstanden sind, mehr zu beobachten.

Aus den Haplotypklassen des 1. Schrittes werden Consensusprofile abgeleitet:

Haplotypklasse des 1. Schrittes	Consensusprofil
1	*212
2	111*
3	2*21

Aus dem paarweisen Vergleich der Häufigkeiten der Consensusprofile geht hervor, daß das Consensusprofil *212 (*steht für 1 oder 2) mit der Erkrankung A assoziiert ist.

Kontingenztabelle für alle Haplotypen

Count

		VAR00002		Total
		1,00	2,00	
VAR00001	1,00	7	2	9
	2,00	16	18	34
	3,00	11	16	27
	4,00	10	3	13
	5,00	4	6	10
	6,00	12	15	27
	Total	60	60	120

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)	Point Probability
Pearson Chi-Square	8,324 ^a	5	,139	,141		
Likelihood Ratio	8,704	5	,121	,140		
Fisher's Exact Test	8,150			,147		
Linear-by-Linear Association	,582 ^b	1	,446	,480	,240	,033
N of Valid Cases	120					

a. 2 cells (16,7%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 4,50.

b. The standardized statistic is ,763.

Clusteranalyse für die Haplotypen

Average Linkage (Between Groups)

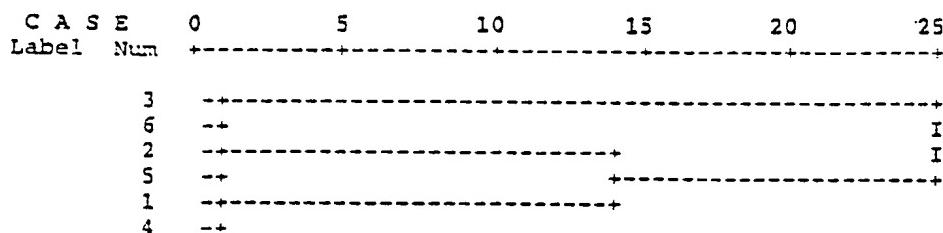
Agglomeration Schedule

Stage	Cluster Combined		Coefficients	Stage Cluster First Appears		Next Stage
	Cluster 1	Cluster 2		Cluster 1	Cluster 2	
1	3	6	1,000	0	0	5
2	2	5	1,000	0	0	4
3	1	4	1,000	0	0	4
4	1	2	1,390	3	2	5
5	1	3	1,720	4	1	0

*****HIERARCHICAL CLUSTER ANALYSIS*****

Dendrogram using Average Linkage (Between Groups)

Rescaled Distance Cluster Combine



Kontingenztabelle für die Verteilung der Haplotypen in 3 Klassen nach dem 1. Schritt

Count

		VAR00002		Total
		1.00	2.00	
VAR00001	1,00	17	5	22
	2,00	20	24	44
	3,00	23	31	54
Total		60	60	120

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)	Point Probability
Pearson Chi-Square	8,094 ^a	2	,017	,017		
Likelihood Ratio	8,470	2	,014	,017		
Fisher's Exact Test	8,139			,017		
Linear-by-Linear Association	5,879 ^b	1	,015	,021	,010	,005
N of Valid Cases	120					

a. 0 cells (.0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 11,00.

b. The standardized statistic is 2,425.

Kontingenztabelle für die Verteilung der Haplotypen in 2 Klassen nach dem 2. Schritt

Count

		VAR00002		Total
		1.00	2.00	
VAR00001	1.00	37	29	66
	3.00	23	31	54
Total	60	60	120	

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	2,155 ^b	1	,142		
Continuity Correction ^a	1,650	1	,199		
Likelihood Ratio	2,162	1	,141		
Fisher's Exact Test				,199	,099
Linear-by-Linear Association	2,137	1	,144		
N of Valid Cases	120				

a. Computed only for a 2x2 table

b. 0 cells (,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 27,00.

Die Erfindung kann im Wesen auch folgendermaßen beschrieben werden:

1. Methode zur Verwendung eines Sets von Oligonukleotiden, die mit gesamtgenomischer DNA und DNA-Zielfragmenten hybridisieren, um damit zugleich die gezielte und simultane Generierung multipler individueller Sequenzen durch Amplifikation, Sequenzierung, und Dekodierung eines Pools von genomischen Sequenzen durchzuführen.
2. Eine Methode zur simultanen Sequenzierung und Analyse von multiplen DNA-Zielfragmenten, die mittels PCR amplifiziert werden
3. Eine Methode wie unter 2. beschrieben erweitert auf alle Nukleinsäuren.
4. Eine Methode zur Identifizierung interindividueller DNA Sequenzunterschiede in Kandidatengenen oder jeder genomischen Zielregion, die Erkrankungen ursächlich zugrundeliegen, genetisches Risiko für eine Erkrankung tragen, oder mit interindividuell unterschiedlicher Ansprechbarkeit auf Medikamente, suchterzeugende Substanzen, oder endogene Liganden einhergehen.
5. Eine Methode wie unter 4. beschrieben, erweitert auf Pflanzengenome, bakterielle Genome, grundsätzlich Genome aller Spezies, so daß in den Bereichen Molekularbiologie, Medizin, Biologie, Veterinärmedizin, Agrarwissenschaften und Ökobiologie Aufschlüsse über die Entstehung unterschiedlicher Merkmale auf der Basis genetischer Variationen gewonnen werden können.
6. Eine Methode zur simultanen Generierung jedweder Nukleinsäuresequenzen und deren Variationsanalyse.
7. Ein spezifisches Verfahren zur Image-Generierung und Image-Analyse, die auf der Basis eines spezifischen Auftragsschemas der individuellen Terminationsreaktionen die unmittelbare Detektion von DNA Sequenzunterschieden, SNPs (single nucleotide polymorphisms), und Indel-Polymorphismen ermöglicht. Ein wesentliches Element der Images/Datenverwaltung liegt auch darin, daß Bandenmuster einer gegebenen Base eines definierten DNA-Segmentes als spezifisches Identifizierungsmuster für jedes Nukleinsäure-Segment dient.
8. Ein Verfahren, das es ermöglicht, DNA-Sequenzen multipler Individuen simultan in einem Gefäß und in einem Vorgang durchzuführen

Im folgenden wird die Erfindung durch Ausführungsbeispiele näher erläutert:

Die erfindungsgemäße Multiplex-Sequenziermethode wurde in einem 15-Plex-Sequenzierungsprojekt verwendet. In analoger Weise können auch 20-, 40- und 55-Plex-Sequenzierprojekte durchgeführt werden.

Das Protokoll verwendet Mikrotiterplatten (96-wells) und Multichannel-Pipetten.

Die gegenwärtige modular aufgebaute Produktionslinie ist Mikrotiterplatten basiert und integriert

1. einen automatischen Pipettierroboter (Biomek 2000, Beckman);
2. PCR-Automaten (MJ Research 3)
3. ultradünne Gel-Direkttransfer-Elektrophorese (DTE)
4. semi-automatisierte parallele Hybridisierung
5. einem Phosphor-Fluor-Imager (Molecular Dynamics)
6. PCR-basierte Image-Analyse mittels 'skilled pattern interpretation'

Gendissektion (Zergliederung), Primer-Design:

PCR-Primer wurden nach dem 'staggered dissection' Prinzip ausgewählt (vgl. Abb. 1b) ausgewählt. Sie erlauben die Amplifizierung mit einer annealing Temperatur von 60 oC. Es wurde das Programm Primerselect aus dem Dnastar-Paket verwendet.

PCR:

Für die vergleichende Sequenzierung des kodierenden und komplementären Stranges wurden 15 PCR-Fragmente pro Individuum (14 genspezifische und 1 HLA-Fragment zur Kontrolle für den kodierenden Strang und 15 genspezifische für den komplementären Strang) einzeln in einem Perkin-Elmer 9600 oder MJ Research PCR-Automat amplifiziert.

Die Reaktionen enthielten 100 ng genomische DNA, 10 mM TrisHCl (pH 8,3), 1,5 mM MgCl₂, 50 KCl, 200 µM von jedem Nukleosid-Triphosphat, 30 pmol von jedem Primer, 3 U Taq-Polymerase, und Wasser in einem Endvolumen von 50 µl. Um unspezifische Polymerase-Aktivität zu verhindern, wurde die Taq-Polymerase in 5 µl Einmal-Reaktionspuffer-Gemisch (10 mM TrisHCl (pH 8,3), 1,5 mM MgCl₂, 50 KCl), während eines Zeitintervalls von 4 min bei 88 oC nachfolgend einer anfänglichen Denaturierung von 94 oC für 4 min zugegeben. Reaktionsansätze wurden für 30-35 Zyklen bei 94 oC (15 sec), 60 oC (15 sec) und 72 oC (30 sec) oder bei 94 oC (15 sec), 60 oC (30 sec) und 72 oC (1 min) amplifiziert.

Die Amplifizierung wurde mittels eines 5 µl Aliquots aus dem PCR-Ansatz auf einem 2 % Agarosegel überprüft. 5'-biotinylierte Primer wurden als Antisense-Primer in dem beschriebenen PCR-Protokoll verwendet, da das Multiplexing-Protokoll auf der Einzelstrangsequenzierung mittels eines Festphasensystems basiert. Allen nachfolgend aufgeführten Schritten liegt eine Einheit von 24 oder einem vielfachen davon an DNA-Proben zugrunde, die einer oder mehreren Membranen/Images entspricht.

Aufreinigung der PCR-Produkte:

Alle 15PCR-Produkte pro Individuum, 10 µl von jedem entsprechen ungefähr 200 ng amplifizierter PCR-DNA, wurden in einem Mikrotiter-Well zusammengefaßt, welche letztlich mindestens 150 µl an PCR-Produkten enthielt. 24 x 4 15-Plex-Pools wurden anschließend über das 96-Well QIAvac manifold-System (Qiagen) aufgereinigt. Die aufgereinigten Pools an

PCR-Produkten wurden in einem Volumen von 60 μ l 1 x TE im 96-well-Maßstab eluiert.

Für die Festphasen-Multiplex-Sequenzierung des kodierenden Strangs wurde einzelsträngige (es) PCR-DNA mittels einer magnetischen Streptavidin/Biotin-Interaktion isoliert. Das 15-biotinylierte PCR-Produkt enthaltende Eluat wurde mit destilliertem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 160 μ l aufgefüllt, mit einem gleichen Volumen an gewaschenen Magnetpartikeln versetzt, um ein Gemisch an einzelstängiger DNA-Matrizen für die Sequenzierung herzustellen. Parallel dazu wurden die Magnetpartikel vorschriftsgemäß gewaschen (Dynal, Oslo). Das ursprüngliche Protokoll wurde für die simultane Immobilisierung der 15 verschiedenen PCR-Produkte dahingehend modifiziert, daß nur ungefähr $\frac{1}{4}$ (4 x anstelle 15 x) der vorgeschriebenen Menge an Magnetpartikeln verwendet wurde.

Zusammengefaßt, 24 x 80 μ l equivalent zu ca. 2 x 1 ml (800 μ g) an Streptavidin-beschichteten Magnetpartikeln wurden 2 x in einer gleichen Menge an 1 x Binde- und Wasch-(B & W) Puffer gewaschen, in dem doppeltem Volumen 2 x B & W-Puffer resuspendiert, und in 24 Aliquots a 160 μ l auf eine 96-Well-Platte verteilt. Anschließend wurden die 160 μ l an gepooltem und gereinigtem PCR-Produkten mit einem gleichen Volumen gewaschener Magentpartikel versetzt und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Das Aufschmelzen der DNA-Helices und die Trennung der DNA-Stränge erfolgte vorschriftsmäßig; es wurden jedoch 4-5-fache Volumina an Puffer und Lösungen verwendet um die 15-fache Menge an prozessierter PCR-DNA auszugleichen. Anschließend wurden die Magnet-Partikel mit der an sie gebundenen esPCR-DNA in 60 μ l Wasser resuspendiert.

Direkte Multiplex (15-plex)-Festphasen T7/Mn-didesoxy-Sequenzierung von esPCR-DNA:
Die Multiplex-Sequenzierreaktionen wurden mit der doppelten Menge an Reagenzien, verglichen mit einer 15-fachen Menge an Reagenzien falls die Reaktionen einzeln prozessiert worden wären, durchgeführt, mit der Ausnahme einer veränderten Menge der 15 verschiedenen Sequenzier-Primer. Die doppelte Menge, 2 pmol von jedem Sequenzierprimer wurden in einer Multiplex-Sequenzierreaktion verwendet.

15-Plex-Primer : jedes in einem Mikrotiter-Well befindliche Gemisch aus 15 Matrizen wurde mit 2 μ l Primercocktail (2 pmol von jedem Primer) und 4 μ l 5 x Reaktionspuffer (75 mM NaCl, 40 mM TrisHCl, pH 7,5) versetzt. Die annealing-Gemische mit einem Gesamtvolumen von 22 μ l wurden in einem Wasserbad 2 min bei 80 °C erhitzt und anschließend für 20 min bei 37 °C inkubiert. Die Proben wurden kurz zentrifugiert und auf Eis abgekühlt. Vor dem Start der Sequenzierreaktion wurden 8 μ l Mangan-DTT-Gemisch (25 mM DTT, 3,75 mM isocitric-Säure, 1,25 mM MnCl₂ in Wasser), dem annealing-Gemisch zugesetzt, gefolgt durch die Zugabe von 4 μ l verdünnter Sequenase (0,5 U Sequenase für 15 Matrizen und 0,03 U

IPNase in 1 x TE) in einem Endvolumen von 34 μ l. Jeweils 7 μ l dieser Gemische wurden mit jeweils 5 μ l eines basenspezifischen Nukleotid-Terminationsgemisches (100 μ M von jedem dNTP, 1 μ M von jedem ddNTP, in 25 mM NaCl) versetzt und anschließend für 15 min bei 37 °C inkubiert. Nach erfolgter Sequenzierreaktion wurden die 96-Well-Platten kurzzeitig zentrifugiert und die Überstände durch magnetische Abtrennung entfernt. Die Terminationsprodukte wurden eluiert, indem 5 μ l Stopp-Lösung (95% Formamid, 20 mM EDTA, 0,05 % Bromphenol-Blau, 0,05 % Xylen-cyanol FF) zugegeben wurden und anschließend eine Erhitzung für 2 min bei 80 °C erfolgte. Die Überstände, die die Gemische der Sequenzierprodukte enthalten wurden erneut durch magnetische Trennung abgenommen, in eine neue Mikrotiterplatte überführt und bei -20 °C gelagert. Vor dem Auftragen wurden die Proben für 2 min bei 80 °C in einem Wasserbad denaturiert und sofort auf Eis abgeschreckt. Für das Sequenziergel wurden von jeder Probe 1 μ l aufgetragen.

Direkte Multiplex (15-Plex) Cycle-Sequenzierung von PCR-DNA:

Für die Sequenzierung des komplementären Stranges wurde eine 15-Plex-Cycle-Sequenzierung mit 2 μ l, entsprechend ca. 40 ng von jedem PCR-Produkt, Thermo Sequenase, unter denen vom Hersteller vorgegebenen Reaktionsbedingungen (Amersham) durchgeführt. Eine Ausnahme, der ursprüngliche Sequenzier-Primer wurde durch ein Gemisch von 15 Primern (0,5 pmol/Primer) ersetzt.

Direkte Transfer-Elektrophorese(DTE):

96 Proben (entsprechend den gepoolten Terminationsreaktionen von 24 Individuen), von jeder 1 μ l, wurden mit einer Hamilton-12-Kanal-Pipette (Hamilton, Reno, NV) auf ein ultradünnes, 0,125 mm, 5 % Acrylamidgel aufgetragen, nach Größe bei 3150 V aufgetrennt und nach dem Protokoll von Richterich und Church (1993) auf eine Nylonmembran (neutral), 1,2 μ m Biodyne A, Pall, 32 x 45 cm übertragen. Der Transfer erfolgte Computer gestützt mittels einem modifizierten Geschwindigkeitsgradienten von 11 cm/h für 80 min und 8 cm/h für 5 Stunden, welches eine optimale Auflösung der Sequenzierprodukte für die Image-Analyse mittels visueller Inspektion erbrachte. Images, die eine direkte Identifizierung von Sequenzunterschieden verschiedener individueller Gene durch visuelle Inspektion ermöglichen, wurden durch die Einführung eines spezifischen Ladeprinzips generiert. Die Terminationsreaktion eines Gemisches einer gegebenen Base G, T, A, C wurden in Blöcken von jeweils 12 Individuen geladen, um hierdurch die Detektion von Mutationen durch die Identifizierung von zusätzlichen und/oder fehlenden Banden (skilled pattern interpretation, vgl. Abb. 1a, 1b und 2) zu erreichen. Nach dem Transfer wurde die DNA durch Bestrahlung mit UV-Licht fixiert.

Sequentielle Hybridisierung:

Hybridisierungssonden wurden wie folgt hergestellt:

Oligonukleotide mit einer Mindestlänge von 18 Nukleotiden und revers komplementär zu dem Zielsegment, welches intergraler Bestandteil des genomischen Zielfragmentes ist, wurden in Portionen von 1 μ l (2 pmol) mit [α -³²P]dATP (6000Ci/mmol; NEN) und 1 μ l (14 U Kalbsthymus terminaler Desoxynukleotidyl-Transferase (USB) entsprechend den Vorgaben des Herstellers endmarkiert. Nach Vorhybridisierung bei 42 °C für mindestens 15 min, wurde eine 10 μ l terminale Transferasereaktion mit 8 ml Hybridisierungspuffer (7 % SDS, 10 % Polyethylenglykol (PEG), 0,25 M NaCl, 0,051 % Phosphorsäure, 82 mM Na₂HPO₄ x H₂O, 10 mM EDTA, 32 mM NaOH; auch als Prähybridisierungslösung zu verwenden) verdünnt, dem Volumen für die Hybridisierung einer Membran. Ein bis zwei Membranen wurden in einer Glasküvette bei 42 °C über Nacht, mindestens für 4 h, hybridisiert. Die Membranen wurden in Einheiten von 5 bei Raumtemperatur mittels eines Automaten für die Membranwaschung (Umwelt- und Ingenieurtechnik GmbH, Dresden) gewaschen, der 5 Waschschritte mit jeweils 1500 ml Waschlösung (1 % SDS, 0,022 % Phosphorsäure, 69 mM Na₂HPO₄ x H₂O, 5 mM EDTA, 32 mM NaOH) durchführte. Nachfolgend wurde jede der Membranen mit Klarsichtfolie bedeckt. Nach Exposition zu einem Molecular Dynamics Phosphor Fluor Imager Screen für 1 bis 20 h wurde die radioaktive Probe mit Stripping-Puffer (0,2 % SDS, 2 mM EDTA, pH 8,3) für 5 -10 min bei 65 °C mindestens 2 x, entfernt. Die Images wurden mittels eines Molecular Dynamics Phosphor Fluor Imagers eingelesen und die Images-Files für die Genotypisierung auf einen PC transferiert.

Protokolle:

Im folgenden werden die Protokolle der Schritte des "Multiplex-PCR-Sequenzierungssystems" (Abb. 1) beschrieben, das für die 15 Plex-Produktionssequenzierung in diesem Verfahren angewendet wurde. Die Protokolle basieren auf Mehrfachwells (96-Well-Format). Es wurden Mehrkanalpipetten verwendet. Die derzeitige modulare Produktionslinie basiert auf Mehrfachwells und schließt ein:

1. einen Beckman Biomek 2000 Pipettierungsroboter,
2. MJ Research Tetrad Thermozykler;
3. eine ultradünne Geldirektübertragungselektrophorese (DTE),
4. eine halbautomatische parallele Probenuntersuchung,
5. einen 'Molecular Dynamics'-Phosphor-Fluor-Imager und
6. eine computergestützte 'skilled pattern analysis' durch 'geschulte Mustererkennung'.

Genzerlegung, Primerdesign: PCR-Primer wurden nach dem 'versetzten' Zerlegungsmuster, das in Abb. 2 dargestellt wird, ausgewählt, um eine vollständige und redundante Abdeckung der bekannten Gensequenz zu erreichen. Sie wurden so ausgewählt, daß eine Amplifikation bei der gleichen Annealingtemperatur von 60 °C ermöglicht wurde. Es wurde das 'PrimerSele'-Programm des 'Dnastar'-Paketes angewendet.

PCR-Verfahren: Um die Kodierungs- und Komplementärstränge vergleichend zu sequenzieren, wurden 15 PCR-Produkte pro Einzelprobe (14 genspezifische und ein HLA-Fragment) wurden als Kontrolle für den Forwardstrang und 15 genspezifische Fragmente für den Reversestrang hergestellt; separat in einem Perkin Elmer 9600 oder in MJ Research Tetrad amplifiziert. Die Reaktionsgemische enthielten 100 ng genomicscher DNS, 10 mM Tris-HCl (pH 8,3), 1,5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 200 μM jedes Nucleosidtriphosphates, 30 pmol jedes Primers, 3 U *Taq*-Polymerase (Boehringer Mannheim) und H₂O mit einem Endvolumen von je 50 μl. Zur Vermeidung einer nichtspezifischen Enzymaktivität wurde *Taq*-Polymerase in einem Volumen von 5 μl, das 1 x Reaktionspuffer (10 mM Tris-HCl (pH 8,3), 1,5 mM MgCl₂, 50 mM KCl) enthielt, innerhalb eines Zeitintervalls von 4 Min. bei 88 °C nach einer 4-minütigen anfänglichen Denaturationsphase von 94 °C zugesetzt. Die Reaktionsgemische wurden 30-35 Zyklen bei 94 °C (15 Sek.), 60 °C (15 Sek.) und 72 °C (30 Sek.) bzw. bei 94 °C (15 Sek.), 60 °C (30 Sek.) und 72 °C (1 Min.) unterzogen. Die Amplifikation wurde kurz geprüft durch Auflösung von 5 μl PCR-Produkten auf einem 2%-igen Agarosegel und Sichtbarmachung der Banden mittels Ethidiumbromid und ultravioletter Bestrahlung. Gewöhnlich wurde ausreichend PCR-DNS für eine doppelte Sequenzanalyse erzeugt. Da sich die Multiplexprotokolle auf ein direktes Festphasensequenzierungsprotokoll stützten, das die Sequenzierung des Kodierungsstrangs gewährleistete, wurden 5'-biotinylierte Primer als Antisenseprimer im beschriebenen PCR-Protokoll eingeführt. Während der folgenden Schritte bildete eine Einheit von 24 einzelnen DNS-Proben oder ein Mehrfaches davon die Arbeitseinheiten, die einer oder einem Vielfachen einer Membran/eines Sequenzbildes ('Images') entsprechen.

Reinigung der PCR-Produkte: Sämtliche 15 PCR-Produkte eines Individuums, 10 μl pro PCR-Produkt entsprechend etwa 200 ng PCR-DNS, wurden in ein Mikrotiterwell gepoolt, das somit etwa mindestens 150 μl PCR-Produkte enthielt. 24 x 4 15-plex-Pools von PCR-Produkten wurden dann einer Reinigung durch das 96-Well-QIA vac-Mehrfachsystem (Qiagen) unterzogen. Die Pools der PCR-Produkte wurden mit 50 μl von 1 x TE-Puffer in ein 96-Well-Format eluiert. Für die auf einer Festphasen-Sequenzierung basierenden Multiplexsequenzierung des Kodierungsstranges wurde einzelsträngige PCR-DNS durch die Interaktion von Streptavidin auf magnetischen 'Beads' mit Biotin abgetrennt. Das eluierte Produktvolumen, das 15 biotinylierte PCR-Produkte enthält, wurde mit destilliertem H₂O auf ein Endvolumen von 160 μl aufgefüllt, um mit einer gleichen Menge gewaschener

magnetischer 'Beads' zusammengebracht zu werden, um die gepoolten PCR-Produkte zu immobilisieren und Gemische einzelsträngiger DNS als Sequenziermatrizen herzustellen. Parallel dazu waren die 'Beads', gemäß den Empfehlungen des Herstellers (Dynal, Oslo), gewaschen worden. Das Protokoll des Herstellers war modifiziert worden, um die gleichzeitige Immobilisierung von 15 verschiedenen PCR-Produkten zu ermöglichen, wobei etwa nur $\frac{1}{4}$ (4x anstatt 15x) der erforderlichen/empfohlenen Menge an 'Beads' verwendet wurde. Kurz gesagt, $24 \times 80 \mu\text{l}$, was etwa $2 \times 1 \text{ ml}$ ($800 \mu\text{g}$) mit Streptavidin überzogenen magnetischen 'Beads' äquivalent ist, wurden zwei Mal in entsprechenden Volumina von 1 x Binde- und Waschpuffer gewaschen, erneut in dem doppelten Volumen von 2x Binde- und Waschpuffer suspendiert, und in 24 Aliquoten von $160 \mu\text{l}$ auf einer 96-Well-Platte verteilt. Dann wurden die gepoolten, gereinigten PCR-Produkte in einem Endvolumen von $160 \mu\text{l}$ mit gleichen Volumina von vorgewaschenen 'Beads' versetzt und 15 Min. bei Zimmertemperatur inkubiert. Das Schmelzen der DNS-Doppelstrangmoleküle und die Abtrennung der DNS-Stränge erfolgten gemäß dem Herstellerprotokoll. Eine vier- bis fünffache Menge von Puffern und Lösungen wurde jedoch für die Akkomodierung der 15-fachen Menge behandelter PCR-DNS verbraucht. Nach Abschluß der Behandlung wurden die Perlen mit gebundener einzelsträngiger PCR-DNS in $16 \mu\text{l} \text{ H}_2\text{O}$ erneut suspendiert.

Direkte Festphasen-Multiplex (15-plex)-T7/Mn-Dideoxy-Sequenzierung einzelsträngiger PCR-DNS: Multiplex-Sequenzierungsreaktionen wurden mit einer doppelten Menge von Reagenzien durchgeführt verglichen mit der 15-fachen Menge von Reagenzien, die erforderlich wäre, wenn die Reaktionen einzeln durchgeführt worden wären, ausgenommen die Mengen der 15 verschiedenen Sequenzierungsprimers. Die doppelte Menge (2 pmol) jedes Sequenzierungsprimers wurde in einer Multiplex-Sequenzierungsreaktion eingesetzt, um dem Annealing der Primer an beide, das Ziel- und das Nachbarfragment, begegnen zu können; siehe auch Abb. 2. *15-Plex-Primer-Annealing:* Jeder Pool von 15 Matrizen, die in einem Mikrotiterwell enthalten waren, wurden mit $2 \mu\text{l}$ eines Primercocktails (2 pmol jedes Primers) und $4 \mu\text{l}$ von 5 Reaktionspuffer (75 mM NaCl , 40 mM Tris-HCl , pH 7,5) gemischt. Diese Annealinggemische von einem gesamten Reaktionsvolumen von $22 \mu\text{l}$ wurden 2 Min. lang in einem Wasserbad von 80°C erhitzt und 20 Min. lang bei 37°C inkubiert. Die Proben wurden kurz zentrifugiert und auf Eis gekühlt. Bevor die Sequenzierungsreaktionen eingeleitet wurden, wurden dem jeweiligen Annealinggemisch $8 \mu\text{l}$ eines Mangan-DTT-Gemisches (25 mM DTT , $3,75 \text{ mM Iso-Zitronensäure}$, $1,25 \text{ mM MnCl}_2$ in H_2O) zugesetzt, gefolgt von $4 \mu\text{l}$ Sequenase-Lösung (0,5 U Sequenase für 15 Matrizen und 0,03 U IPPase in 1 x TE), was ein Endvolumen von $34 \mu\text{l}$ ergab. $7 \mu\text{l}$ dieser Gemische wurden in $5 \mu\text{l}$ basenspezifische Nukleotidgemische ($100 \mu\text{M}$ jedes dNTP: $1 \mu\text{M}$ jedes ddNTP, in 25 mM NaCl) aliquotiert und 15 Min. bei 37°C inkubiert. Nachdem die Extension beendet war, wurde die 96-Well-Platte kurz zentrifugiert, die überstehende Flüssigkeit wurde mittels magnetischer Trennung entfernt; die

Terminationsprodukte wurden durch Zusatz von 5 μ l Stopplösung (95 % Formamid, 20 mM EDTA, 0,05 % Bromphenolblau, 0,05 % Xylenzyanol FF) und eine 2-minütige Erhitzung auf 80°C eluiert. Die überstehende Flüssigkeit, die die Pools der terminierten Sequenzierungsreaktionen enthält, wurde mittels magnetischer Trennung entfernt und auf eine neue Mikrotiterplatte aufgetragen und bei -20°C gelagert. Unmittelbar vor dem Aufbringen wurden die Proben 2 Min. lang in einem Wasserbad von 80°C denaturiert und schnell gekühlt auf Eis/Wasser, 1 μ l pro Probe wurde auf das Sequenzierungsgel aufgebracht.

Direkte Multiplex (15-plex)-'Cycle' Sequenzierung von PCR-DNS

Die Komplementärstrangsequenzierung erfolgte mit einer 15-plex-'Cycle'-Sequenzierung bei Verwendung von 2 μ l des jeweiligen PCR-Produktes, was etwa 40 ng äquivalent ist, Thermosequenase und Anwendung der durch den Lieferanten (Amersham) beschriebenen Reaktionsbedingungen, mit der Ausnahme, daß der Sequenzierungsprimer durch ein Gemisch von 15 Primern, 0,5 pmol pro Primer, ersetzt wurde. So wurden 15 Sequenzierungsreaktionen durchgeführt mit der einfachen Menge der Reagenzien, was einem Fünfzehntel der Reagenzien, die für die Standardreaktionen verwendet wurden, entspricht.

Direktauftragselektrophorese (DTE): 96 Proben (die den gepoolten basenspezifischen Terminationsreaktionen von 24 Individuen entsprachen), je 1 μ l, wurden mit einer 12-kanaligen Hamilton-Pipette (Hamilton, Reno, NV) auf ein ultradünnes, 0,125 mm, 5 %-iges Akrylamidgel aufgebracht, aufgelöst nach der Größe bei 3150 V und auf eine Nylonmembran (neutral 1,2 μ m Biodyne A, Pall, Größe: 32 x 45 cm) durch DTE aufgebracht, wie im einzelnen von Richterich und Church (1993) beschrieben wurde. Die Übertragung war computergesteuert und folgte einem modifizierten Geschwindigkeitsgradienten von 11 cm/Std für 80 Min., und von 8 cm/Std. für 5 Stunden, was für gleichmäßige Abstände zwischen den Banden von etwa 0,8 mm, optimal für eine Bildanalyse durch visuelle Prüfung, sorgte. Die 'Sequenzimages', die eine Identifizierung der Sequenzunterschiede zwischen den individuellen Genen unmittelbar durch visuelle Prüfung ermöglichen, wurden durch Einführung eines spezifischen Ladesystems erzeugt: die Terminationsreaktionspools einer gegebenen Base- G, T, A, C wurden in Blocks von je 12 Individuen geladen, um die Identifizierung von Varianten durch Feststellung zusätzlicher und/oder fehlender Banden zu erleichtern ('Skilled Pattern Interpretation'-geschulte Mustererkennung). Nach der Übertragung der DNS-Formen von den Gelen auf die Nylonmembranen wurden sie 30 Sekunden lang durch ultraviolettes Licht vernetzt.

Sequentielle Hybridisierung: Die 'Proben' wurden wie folgt hergestellt:
Oligonukleotide, mindestens 18 nt lang, und reverskomplementär zu den 'Tag'-Sequenzen, die

Bestandteil der genomischen Zielsegmente sind (siehe Abb. 2), wurden durch Zusatz von etwa 15 dAMP-Resten aus 2,6 µl [α -³²P] dATP (6000 Ci/mmol; NEN) in Portionen von 1 µl (2pmol) markiert mit 1 µl (14 U) Kalbsthymusdrüsenterminal-deoxynucleotidyltransferase (USB) gemäß den Herstellerempfehlungen. Nach einem Prähybridisierungsschritt von mindestens 15 Min. bei 42 °C wurde eine 10 µl Terminaltransfersreaktion in 8 ml Hybridisierungspuffer [7 % SDS, 10 % Polyäthylenglykol (PEG), 0,25 M NaCl, 0,051 % H₃PO₄, 82 mM Na₂HPO₄ x H₂O, 10 mM EDTA (freie Säure), 32 mM NaOH; auch für die Prähybridisierung verwendet], dem berechneten Volumen für die Hybridisierung einer Membran, verdünnt. Gewöhnlich wurden 1 bis 2 Membranen in ein Glasrohr (Container) eingebracht und über Nacht, zumindest 4 Stunden lang, bei 42 °C hybridisiert. Die Membranen wurden in Gruppen von 5 bei Zimmertemperatur unter Einsatz eines automatisierten Gerätes für die Blotinkubation und das Waschen (Umwelt- und Ingenieurtechnik GmbH, Dresden), programmiert für 5 Waschschrifte mit 1800 ml Puffer, der 1 % SDS, 0,022 % H₃PO₄, 69 mM Na₂H₂PO₄ x H₂O, 5 mM EDTA (freie Säure), 32 mM NaOH enthält, gewaschen. Jede der feuchten Membranen wurde zwischen eine Saran-Hülle und eine Polyesterunterlage gelegt. Nach Exposition in einem 'Molecular Dynamics'-Phosphor-Fluor- Imager bei Zimmertemperatur 1 bis 20 Stunden lang, wurden die radioaktiven Sonden mit 0,2 % SDS und 2 mM EDTA (freie Säure, eingestellt auf einen pH von 8,3 mit einer tris-Lauge) mindestens zweimal 5 bis 10 Min. lang bei 65 °C entfernt. Während der 15 Hybridisierungen waren die Auflösung und das Verhältnis Signal zum Hintergrund im wesentlichen die gleichen, wie sie mit dem optimierten Uniplex-Verfahren erzielt wurden und damit war die Bildqualität, die für die Identifizierung von Sequenzvarianten mit hoher Genauigkeit wünschenswert ist, garantiert. Die Sequenzbilder wurden eingescannt und die Bilddateien wurden auf Computer übertragen für das Lesen der Genotypen.

Ergebnis:

Vergleichende Sequenzanalyse des humanen μ -Opioid-Rezeptorgens

Das humane μ -Opioid-Rezeptoren inklusive seiner 5'-regulierenden, kodierenden und wichtiger intronischer Sequenzen wurde in 250 Individuen vergleichend sequenziert. Die Gruppe der 250 untersuchten Individuen beinhaltete Süchtige mit einer Familiengeschichte, der Krankheit und Kontrollen. Insgesamt wurden 1,7 Mbasen analysiert. Die Analyse der Daten zeigte, daß eine spezifische Konstellation von Polymorphismen (Haplotyp) mit einer signifikant erhöhten Frequenz in Individuen mit einer genetischen Disposition zu Drogenmißbrauch beobachtet wurde. das Projekt die folgenden Schritte:

- a) Klonierung der 5'-regulierenden und wichtiger intronischer Sequenzen, welches die vorher bekannte cDNA-Sequenzinformation (2162bp) auf insgesamt 6968 bp erweiterte,

- b) Dissektion (Zergliederung) der gesamten genomischen Sequenz sowohl des kodierenden als auch des komplementären Stranges in PCR-Fragmente, 15-Plex-Sequenzierung beider Stränge. Generierung von zwei Sätzen a 11 Membranen, die pro Strang 1,7 Mbasen an vergleichender Sequenzinfomation enthalten, 15 Hybridisierungszyklen pro Membran, Auswertung von ca. 330 Images über 'skilled pattern analysis'
- c) Determinierung des gesamten polymorphen Spektrums mit insgesamt 37 Varianten, Haplotyp-Analyse von 23 Varianten resultierend in zahlreichen individuellen Genprofilen, Derterminierung von allelischen Kategorien über similarity analyse.
- d) Identifizierung einer allelischen Kategorie in US-Amerikanern afrikanischer Abstammung, die mit der genetischen Disposition zu Drogenmißbrauch assoziiert ist.

Patentansprüche:

1. Methode zur Identifizierung, Darstellung und Auswertung sowie Interpretation interindividueller DNA Sequenzunterschiede, dadurch gekennzeichnet, daß man

- die genomische DNA der zu untersuchenden Individuen isoliert,
- Segmente der zu vergleichenden Gene, genetischen Regionen, Genome definiert,
- diese Segmente mittels PCR unter Verwendung hochspezifischer Oligonukleotide gezielt isoliert und in einer ausreichenden Anzahl von Kopien herstellt,
- eine simultane Sequenzierung aller gewonnenen Gensegmente, die nun als PCR-Produkte vorliegen, durchführt,
- das dadurch entstehende Gemisch von Terminationsreaktionen, das die individuellen Sequenzen aller Gensegmente enthält, anschließend auf einem Sequenziergel elektrophoretisch trennt und
- mittels direkter Transferelektrophorese auf eine Membran überträgt,
- anschließend durch Hybridisierung der Membran mit einem markierten, hochspezifischen Oligonukleotid die individuellen Sequenzen eines bestimmten Gensegmentes aus dem ursprünglichen Gemisch sichtbar macht,
- diesen Vorgang sooft wiederholt, bis alle Gensegmente aus dem ursprünglichen Pool detektiert sind
- und anschließend durch Image-Analyse interindividuelle DNA-Sequenzunterschiede detektiert, und durch mathematische Aufarbeitung ein Genprofilmuster erstellt und auswertet.

2. Methode nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß sie auf alle Nukleinsäuren angewendet wird.

3. Methode nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß multiple Gensegmente eines bestimmten Individuums simultan sequenziert werden, oder ein und dasselbe Segment simultan in multiplen Individuen sequenziert werden.

4. Methode nach Anspruch 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß die simultane Sequenzierung mit multiplen, hochspezifischen Sequenzierprimern durchgeführt wird, wobei die Anzahl der Sequenzierprimer der Anzahl der Gensegmente entspricht.

5. Methode nach Anspruch 1-3, dadurch gekennzeichnet, daß die simultane Sequenzierung mit multiplen, hochspezifischen Sequenzierprimern durchgeführt wird, wobei die Anzahl der Sequenzierprimer der Anzahl der virtuellen Gensegmente entspricht.

6. Methode nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß virtuelle Gensegmente dadurch gekennzeichnet sind, daß sie Bestandteil eines mehrere Gensegmente umfassenden PCR-Fragmentes sind.
7. Methode nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß sie für 20 – 30, bevorzugt 24, Individuen, durchgeführt wird, so daß eine Membran die Sequenzen aller Gensegmente der untersuchten Individuen enthält.
8. Methode nach einem Ansprüchen 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß deine Membran nicht nur die Sequenzen aller Gensegmente einzelner Individuen enthält, nämlich 20-30, bevorzugt 24, Individuen enthält, sondern alternativ auch die Sequenzen eines Gensegmentes in multiplen Individuen enthält.
9. Methode nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß sie 2-100 x 20-30, bevorzugt 24, enthält.
10. Methode nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß spezifisch für den Nukleinsäuresequenzvergleich die basenspezifischen Terminationsreaktionen von jeweils 12 Individuen nebeneinander angeordnet werden, so daß auf der Membran und schließlich auf dem Image jeweils Blöcke von je 12 individuellen G-Reaktionen, und analog T-, A-, und C-Reaktionen sichtbar werden.
11. Methode nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß die Sequenzunterschiede unmittelbar dargestellt werden.
12. Methode nach einem der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, daß die hochspezifischen Oligonukleotide radioaktiv oder mittels anderer Verfahren markiert sind.
13. Methode nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, daß die Sichtbarmachung definierter DNA-Sequenzen aus dem Reaktionsgemisch dadurch erfolgt, daß die hochspezifischen Oligonukleotide mit einer DNA-Sequenz hybridisiert, die integraler Bestandteil eines definierten genomischen Zielsegmentes ist, und die sich an die Sequenzierprimerhybridisierungsregion anschließt.
14. Methode nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, daß die Sichtbarmachung definierter DNA-Sequenzen aus dem Reaktionsgemisch dadurch erfolgt, daß die hochspezifischen Oligonukleotide mit einer DNA-Sequenz hybridisiert, die extern synthetisiert wurde und intergraler Bestandteil des PCR- oder Sequenzierprimers ist.

15. Methode nach einem der Ansprüche 1 bis 14, dadurch gekennzeichnet, daß Genprofilmuster, die eine genetische Differenzierung für das Erkennungsrisiko bzw. für die Ausprägung phänotypischer Merkmale jeder Art in jeder Species zulassen, durch Reduktion der Anzahl von Geno- bzw. Haplotypen mittels Klassifizierungsverfahren unter Ausnutzung des Häufigkeitsvergleichs von Geno- bzw. Haplotypen zweier verschiedener phänotypischer Gruppen einer Spezies erstellt werden.
16. Verwendung eines definierten Sets von Oligonukleotiden für diagnostische Zwecke, wobei die Oligonukleotide mit gesamtgenomischer DNA und DNA-Zielfragmenten hybridisieren, um damit zugleich die gezielte und simultane Generierung multipler individueller Sequenzen durch Amplifikation, Sequenzierung und Dekodierung eines Pools von genomischen Sequenzen durchzuführen
17. Verwendung der Methode gemäß der Ansprüche 1 bis 15 zur Identifizierung interindividueller DNA Sequenzunterschiede in Kandidatengenen, Genomen oder jeder genomischen Zielregion, die Erkrankungen ursächlich zugrundeliegen, genetisches Risiko für eine Erkrankung tragen, oder mit interindividuell unterschiedlicher Ansprechbarkeit auf Medikamente, suchterzeugende Substanzen, oder endogene Liganden einhergehen.
18. Verwendung nach Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, daß Pflanzengenome, bakterielle Genome, grundsätzlich Genome aller Spezies, so daß in den Bereichen Molekularbiologie, Medizin, Biologie, Veterinärmedizin, Agrarwissenschaften und Ökobiologie Aufschlüsse über die Entstehung unterschiedlicher Merkmale auf der Basis genetischer Variationen gewonnen werden können.
19. Verwendung der Methode gemäß Ansprüche 1 bis 15 zur Image-Generierung und Image-Analyse, die auf der Basis eines spezifischen Auftragsschemas der individuellen Terminationsreaktionen die unmittelbare Detektion von DNA Sequenzunterschieden, SNPs (single nucleotide polymorphisms), und Indel-Polymorphismen. und der Images/Datenverwaltung indem Bandenmuster einer gegebenen Base eines definierten DNA-Segmentes als spezifisches Identifizierungsmuster für jedes Nukleinsäure-Segment dienen.
20. Verwendung der Methode gemäß Ansprüche 1 bis 15 um DNA-Sequenzen multipler Individuen simultan in einem Gefäß und in einem Vorgang durchzuführen.

1/6

'Multiplex PCR Sequenzierung' :

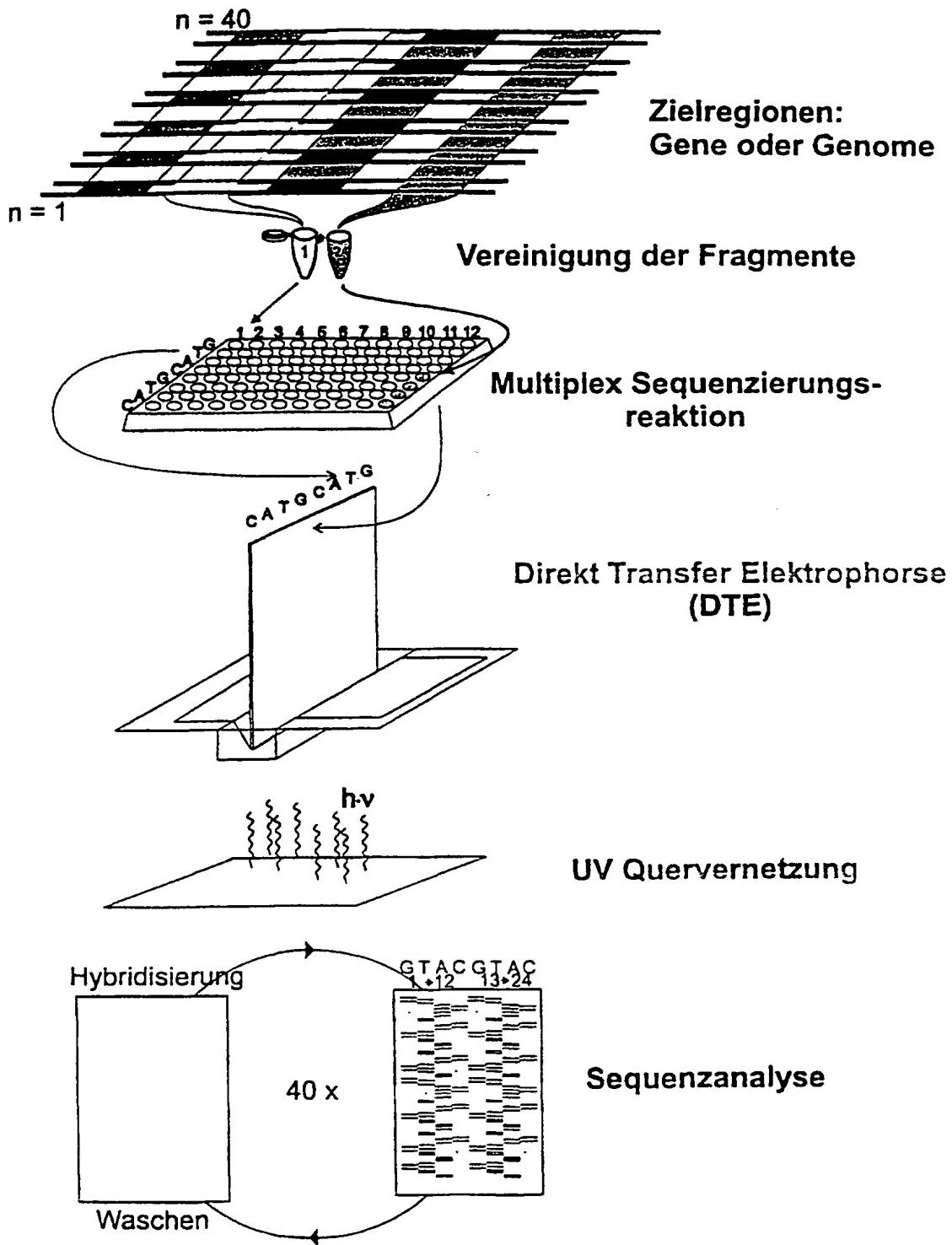


Abb. 1a

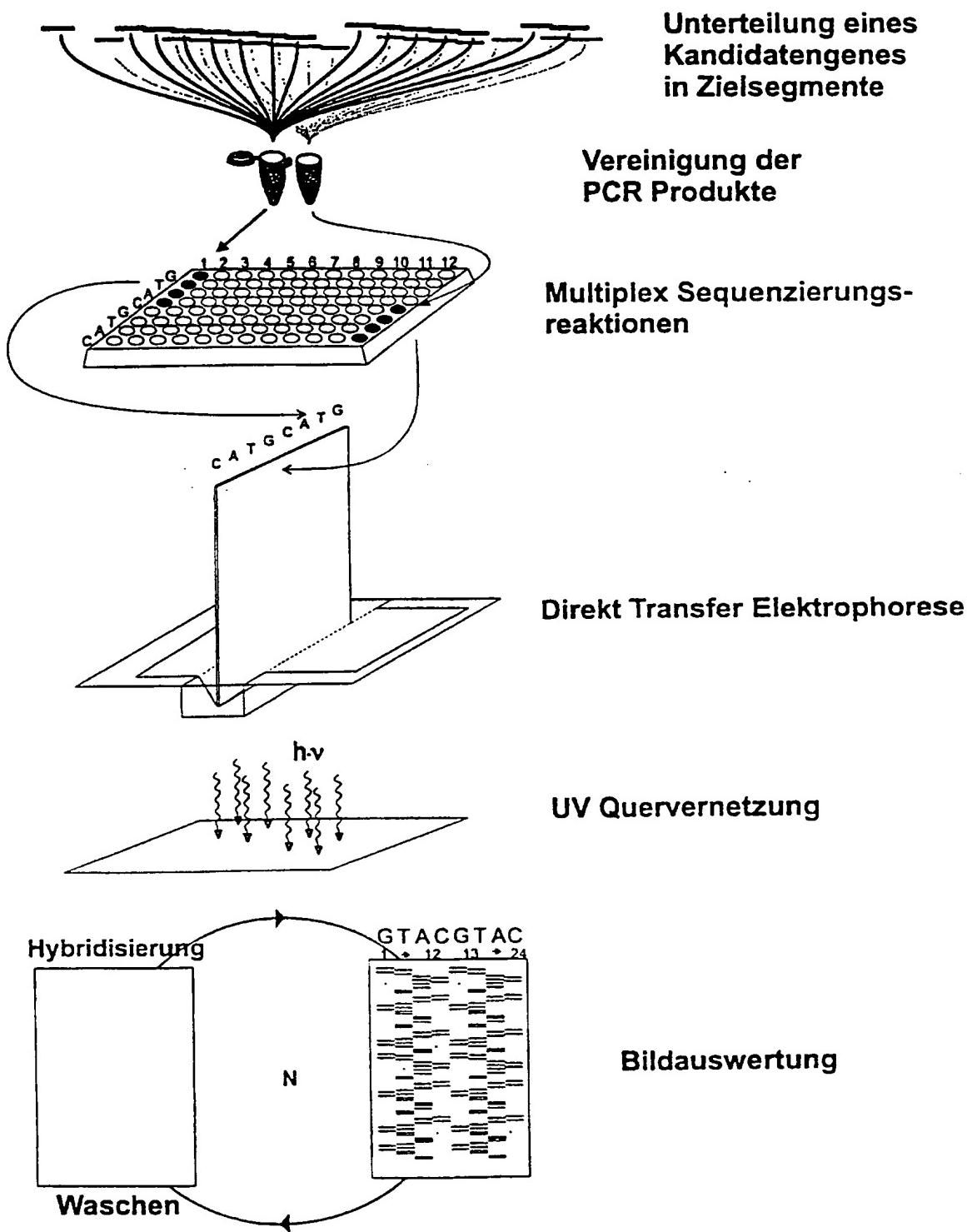
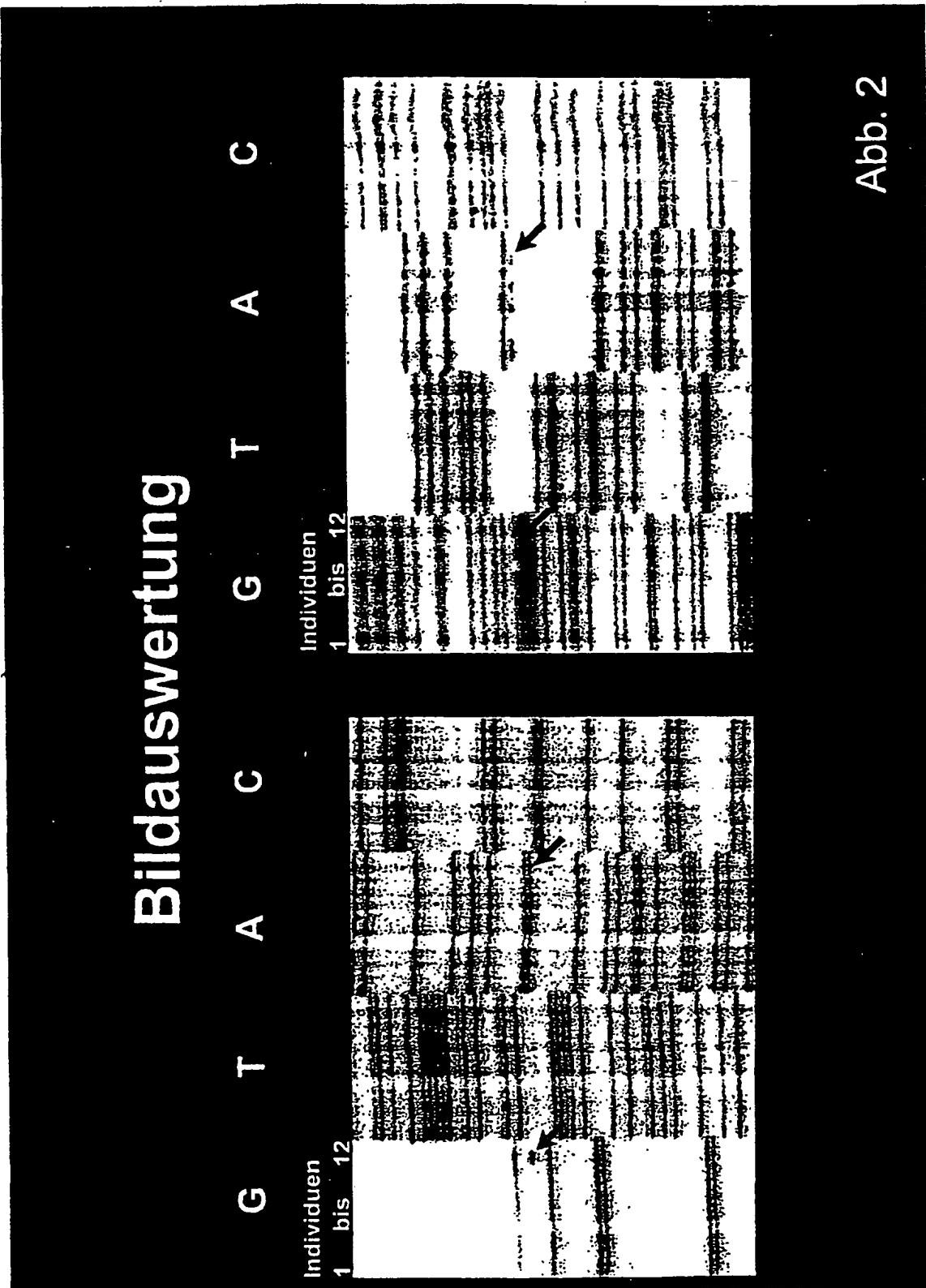
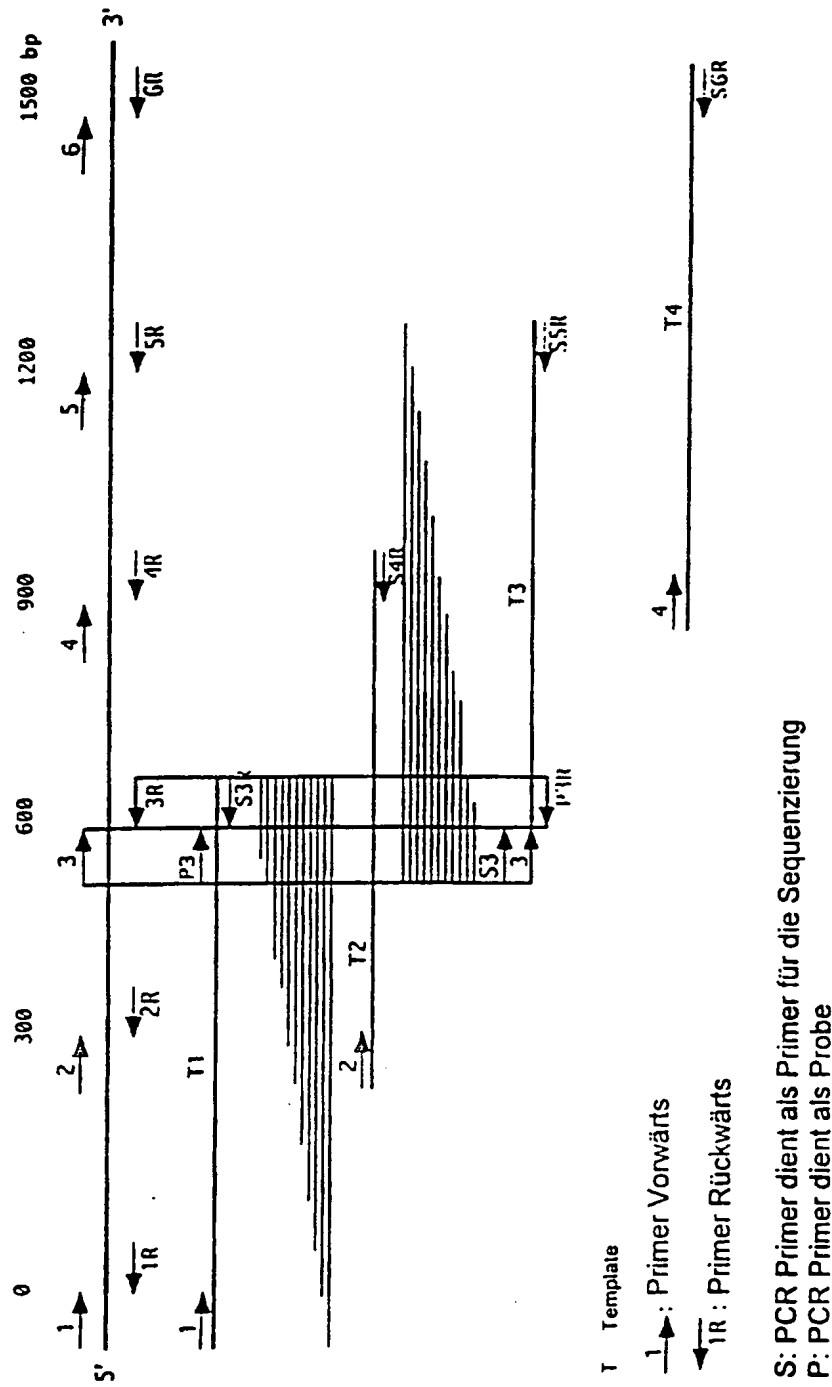


Abb.1b



Unterteilung der genomischen Zielregion



S: PCR Primer dient als Primer für die Sequenzierung
 P: PCR Primer dient als Probe

Abb. 3

**'Multiplex PCR Sequenzierung' des Humanen μ opiat Rezeptor Genes:
Unterteilung in Zielsegmente**

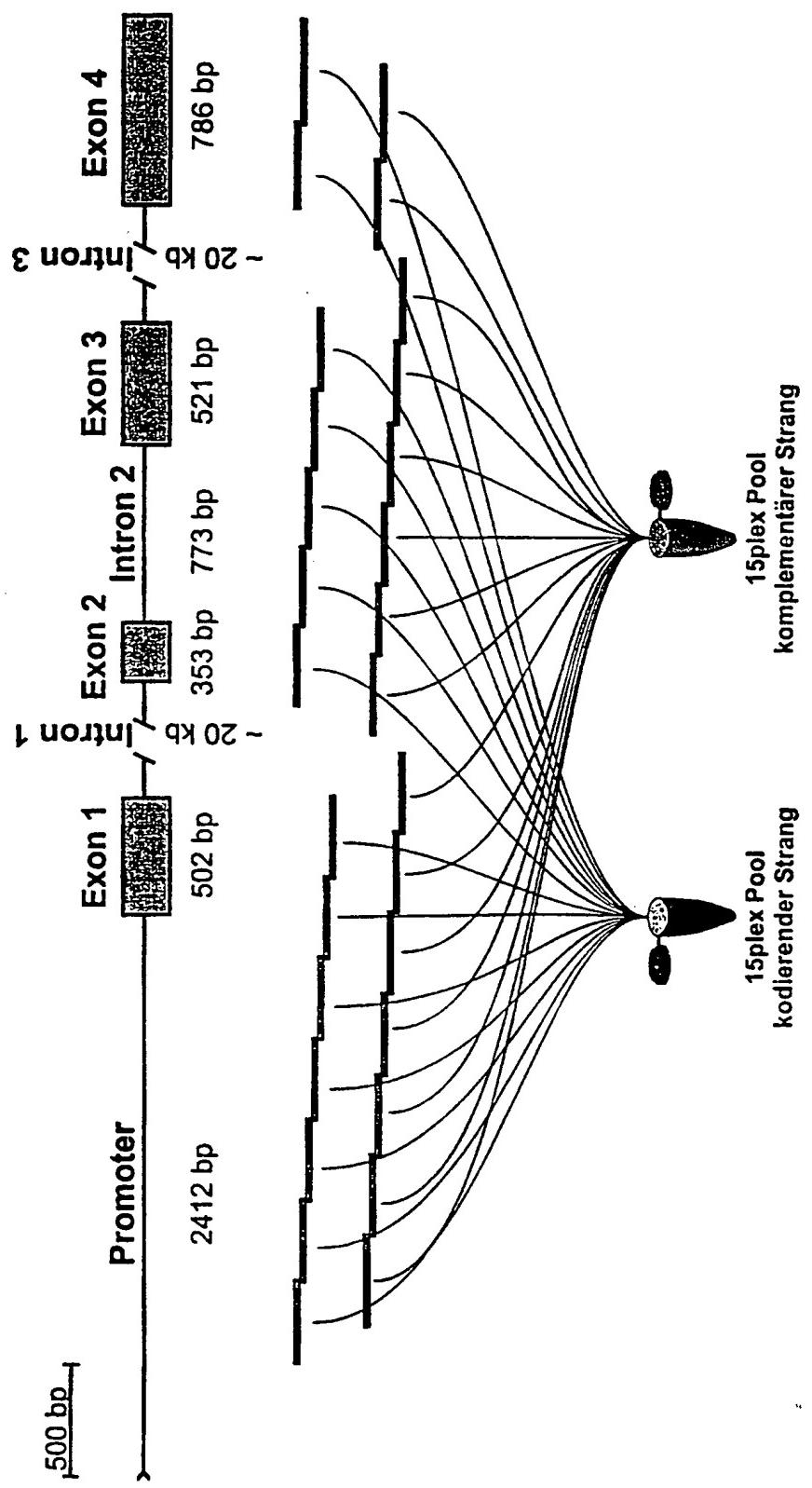
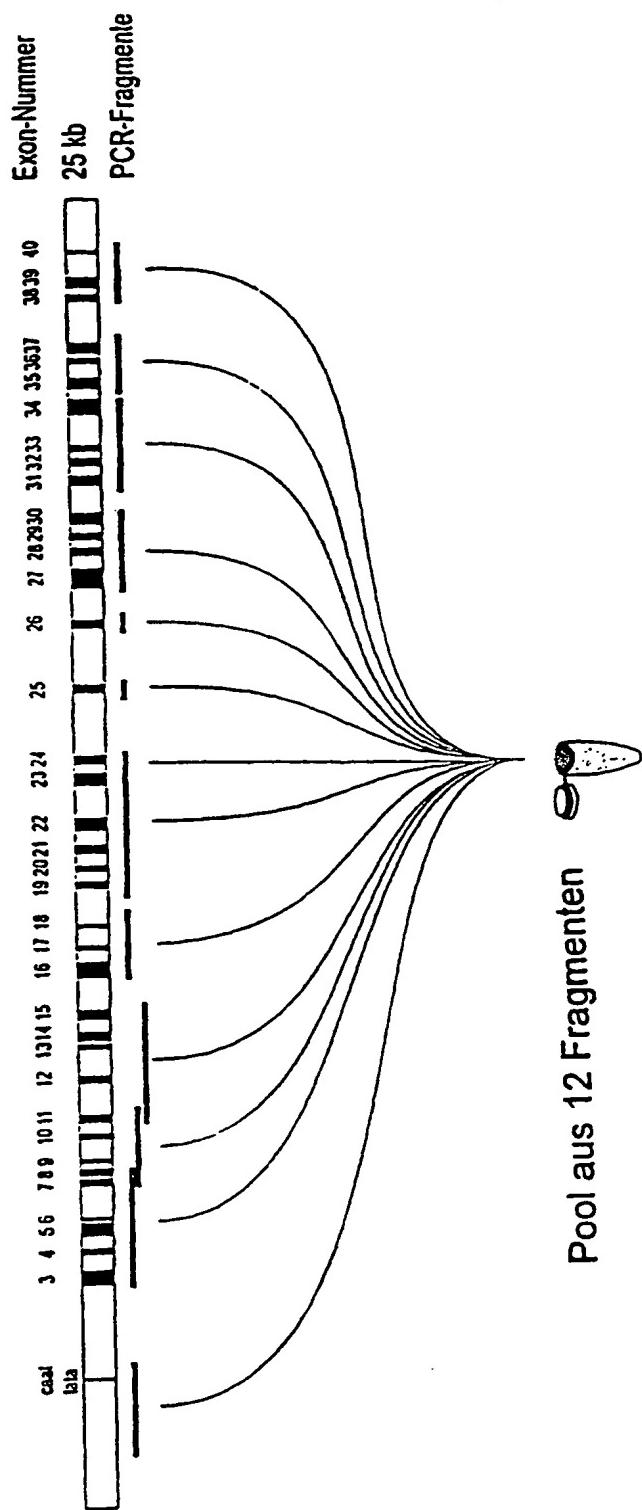


Abb. 4

**„Multiplex Sequenzierung“
Unterteilung des „ β -myosin heavy chain“ Genes
in PCR-Fragmente**



Multiplex PCR Sequenzierung
mit 40 Sequenzierprimern

Abb. 5

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern. Application No
PCT/DE 99/01385

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 C12Q1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 6 C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP 0 303 459 A (HARVARD COLLEGE) 15 February 1989 (1989-02-15) cited in the application the whole document ---	1-20
A	CHURCH ET AL: "genomic sequencing" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE, USA, vol. 81, April 1984 (1984-04), pages 1991-1995, XP002114777 the whole document ---	1-20
A	WO 96 36737 A (RABANI ELY MICHAEL) 21 November 1996 (1996-11-21) page 1-15 ---	1-20
	-/-	

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

Date of mailing of the international search report

9 September 1999

22/09/1999

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Reuter, U

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internatinal Application No
PCT/UE 99/01385

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	TIZARD R ET AL: "IMAGING OF DNA SEQUENCES WITH CHEMILUMINESCENCE" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, vol. 87, no. 12, 1 June 1990 (1990-06-01), pages 4514-4518, XP000310567 ISSN: 0027-8424 the whole document ----	1-20
A	CHAMBERLAIN, JEFFREY S. ET AL: "Multiplex PCR for the diagnosis of Duchenne muscular dystrophy" PCR PROTOC.: GUIDE METHODS APPL. (1990), 272-81. EDITOR(S): INNIS, MICHAEL A. PUBLISHER: ACADEMIC, SAN DIEGO, CALIF. , XP002114778 the whole document ----	1-20
A	YANG M M ET AL: "A PROSPECTUS FOR MULTISPECTRAL-MULTIPLEX DNA SEQUENCING" BIO/TECHNOLOGY, vol. 7, no. 2, 1 February 1989 (1989-02-01), pages 576-580, XP000371859 ISSN: 0733-222X the whole document ----	1-20
P,X	TIMMERMANN B ET AL: ".beta.-2 Adrenoceptor genetic variation is associated with genetic predisposition to essential hypertension: The Bergen Blood Pressure Study" KIDNEY INTERNATIONAL, vol. 53, no. 6, June 1998 (1998-06), pages 1455-1460, XP002106248 ISSN: 0085-2538 the whole document -----	1-20

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/UE 99/01385

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)			Publication date
EP 0303459	A 15-02-1989	US 4942124 A			17-07-1990
		CA 1339727 A			17-03-1998
		JP 1137982 A			30-05-1989
		JP 2665775 B			22-10-1990
		US 5149625 A			22-09-1992
WO 9636737	A 21-11-1996	AU 5797696 A			29-11-1996

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 99/01385

A. KLASSEFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 6 C12Q1/68

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 C12Q

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der Internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	EP 0 303 459 A (HARVARD COLLEGE) 15. Februar 1989 (1989-02-15) in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument ---	1-20
A	CHURCH ET AL: "genomic sequencing" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE, USA, Bd. 81, April 1984 (1984-04), Seiten 1991-1995, XP002114777 das ganze Dokument ---	1-20
A	WO 96 36737 A (RABANI ELY MICHAEL) 21. November 1996 (1996-11-21) Seite 1-15 ---	1-20
		-/-

Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfindenderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfindenderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

Absendedatum des Internationalen Recherchenberichts

9. September 1999

22/09/1999

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Reuter, U

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/DE 99/01385

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	TIZARD R ET AL: "IMAGING OF DNA SEQUENCES WITH CHEMILUMINESCENCE" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, Bd. 87, Nr. 12, 1. Juni 1990 (1990-06-01), Seiten 4514-4518, XP000310567 ISSN: 0027-8424 das ganze Dokument ----	1-20
A	CHAMBERLAIN, JEFFREY S. ET AL: "Multiplex PCR for the diagnosis of Duchenne muscular dystrophy" PCR PROTOC.: GUIDE METHODS APPL. (1990), 272-81. EDITOR(S): INNIS, MICHAEL A. PUBLISHER: ACADEMIC, SAN DIEGO, CALIF., XP002114778 das ganze Dokument ----	1-20
A	YANG M M ET AL: "A PROSPECTUS FOR MULTISPECTRAL-MULTIPLEX DNA SEQUENCING" BIO/TECHNOLOGY, Bd. 7, Nr. 2, 1. Februar 1989 (1989-02-01), Seiten 576-580, XP000371859 ISSN: 0733-222X das ganze Dokument ----	1-20
P, X	TIMMERMANN B ET AL: ".beta.-2 Adrenoceptor genetic variation is associated with genetic predisposition to essential hypertension: The Bergen Blood Pressure Study" KIDNEY INTERNATIONAL, Bd. 53, Nr. 6, Juni 1998 (1998-06), Seiten 1455-1460, XP002106248 ISSN: 0085-2538 das ganze Dokument -----	1-20

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 99/01385

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie			Datum der Veröffentlichung
EP 0303459 A	15-02-1989	US	4942124 A		17-07-1990
		CA	1339727 A		17-03-1998
		JP	1137982 A		30-05-1989
		JP	2665775 B		22-10-1990
		US	5149625 A		22-09-1992
WO 9636737 A	21-11-1996	AU	5797696 A		29-11-1996